PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
C07K 14/47, 19/00, A61K 38/17, G01N 33/00

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/42481

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. August 1999 (26.08.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/00554

(22) Internationales Anmeldedatum: 22. Februar 1999 (22.02.99)

(30) Prioritätsdaten:
198 07 390.9 21. Februar 1998 (21.02.98) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: BIRCHMEIER, Walter [DE/DE]; Goethestrasse 14, D-16341 Schwanebeck (DE). VON KRIES, Jens-Peter [DE/DE]; Meraner Strasse 49 b, D-16341 Zepernick (DE).

(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: AGENTS FOR TREATING HUMAN ILLNESSES BASED ON β-CATENIN, AND THE PRODUCTION AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: MITTEL ZUR THERAPIE VON MENSCHLICHEN ERKRANKUNGEN, AUSGEHEND VON β-CATENIN, SEINE HERSTELLUNG UND SEINE VERWENDUNG

(57) Abstract

β-catenin is a central molecule of the Wnt signal path. Increasing β-catenin in the cell leads to the translocation in the cell nucleus and to the interaction with transcription factors of the LEF-1/TCF family. This can lead to colonic cancers and melenomas (oncogenic signal path). However, β-catenin also interacts with the tumor-suppressor genes APC, conductin and E-cadherin which have a contrary effect on the cell (anti-oncogenic effect). The invention relates to peptides derived from LEF-1-/TCF-4-transcription factors and analogous molecules in the treatment of tumors, especially for treating colonic cancers and melanomas. These peptides and analogous molecules influence the interaction between β-catenin and LEF-1/TCF. The invention can be used in the fields of pharmaceuticals and medicine. The invention essentially relates to peptides, said peptides comprising the parts of the LEF-1/TCF-4-transcription factors, and to the variants and mutations thereof. The peptides are preferably comprised of 10-40 amino acids from the N-terminal area of LEF-1 or TCF-4. The invention also relates to peptides or analogous molecules derived from the armadillo region of β-catenin which were identified as interaction domains with LEF-1/TCF, APC, conductin and E-cadherin. These peptides or analogous molecules can likewise inhibit the interaction between β-catenin and LEF-1/TCF, or in the case of APC or conductin, can increase the concentration of β-catenin in the cell. These last molecules can be used in order to influence the formation of tissue and organs, for example, in order to promote hair growth.

(57) Zusammenfassung

β-Catenin ist ein zentrales Molekül des Wnt-Signalweges. Erhöhung von β-Catenin in der Zelle führt zur Translokation in den Zellkern und zur Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der LEF-1/TCF-Familie. Dies kann zu Kolonkarzinomen und Melanomen führen (onkogener Signalweg). β-Catenin interagiert aber auch mit den Tumorsuppressorgenen APC, Conductin und E-Cadherin, die eine gegenteilige Wirkung auf die Zelle ausüben (anti-onkogene Wirkung). Die Erfindung betrifft von LEF-1-/TCF-4-Transkriptionsfaktoren abgeleitete Peptide und analoge Moleküle in der Tumortherapie, insbesondere zur Behandlung von Kolonkarzinomen und Melanomen. Diese Peptide und analogen Moleküle beeinflussen die Interaktion zwischen β-Catenin und LEF-1/TCF. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die pharmazeutische Industrie und die Medizin. Wesentlicher Teil der Erfindung sind Peptide, die Teile der LEF-1-/TCF-4-Transkriptionsfaktoren umfassen, und ihre Varianten und Mutanten. Sie bestehen vorzugsweise aus 10-40 Aminosäuren aus dem N-terminalen Bereich von LEF-1 bzw. TCF-4. Im weiteren umfaßt die Erfindung Peptide oder analoge Moleküle, abgeleitet aus der Armadillo-Region von β-Catenin, die als Interaktionsdomänen zu LEF-1/TCF, APC, Conductin und E-Cadherin identifiziert wurden. Diese Peptide oder analogen Moleküle können ebenso die Interaktion zwischen β-Catenin und LEF-1/TCF hemmen, oder, wie im Falle von APC oder Conductin, die Konzentration von β-Catenin in der Zelle erhöhen. Diese letzteren Moleküle können zur Beeinflussung von Gewebe- und Organbildung, z.B. zur Förderung des Haarwuchses eingesetzt werden.

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien
AM	Armenien
AT	Österreich
AU	Australien
AZ	Aserbaidschan
BA	Bosnien-Herzegowina
BB	Barbados
BE	Belgien
BF	Burkina Faso
BG	Bulgarien
BJ	Benin
BR	Brasilien
BY	Belarus
CA	Kanada
CF	Zentralafrikanische Republik
CG	Kongo
CH	Schweiz
CI	Côte d'Ivoire
CM	Kamerun
CN	China
CU	Kuba
CZ	Tschechische Republik
DE	Deutschland
DK	Dänemark
EE	Estland
ES	Spanien
FI	Finnland
FR	Frankreich
GA	Gabun
GB	Vereinigtes Königreich
GE	Georgien
GH	Ghana
GN	Guinea
GR	Griechenland
HU	Ungarn
IE	Irland
IL	Israel
IS	Island
IT	Italien
JP	Japan
KE	Kenia
KG	Kirgisistan
KP	Demokratische Volksrepublik Korea
KR	Republik Korea
KZ	Kasachstan
LC	St. Lucia
LI	Liechtenstein
LK	Sri Lanka
LR	Liberia
LS	Lesotho
LT	Litauen
LU	Luxemburg
LV	Lettland
MC	Monaco
MD	Republik Moldau
MG	Madagaskar
MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien
ML	Mali
MN	Mongolei
MR	Mauretanien
MW	Malawi
MX	Mexiko
NE	Niger
NL	Niederlande
NO	Norwegen
NZ	Neuseeland
PL	Polen
PT	Portugal
RO	Rumänien
RU	Russische Föderation
SD	Sudan
SE	Schweden
SG	Singapur
SI	Slowenien
SK	Slowakei
SN	Senegal
SZ	Swasiland
TD	Tschad
TG	Togo
TJ	Tadschikistan
TM	Turkmenistan
TR	Türkei
TT	Trinidad und Tobago
UA	Ukraine
UG	Uganda
US	Vereinigte Staaten von Amerika
UZ	Usbekistan
VN	Vietnam
YU	Jugoslawien
ZW	Zimbabwe

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

MITTEL ZUR THERAPIE VON MENSCHLICHEN ERKRANKUNGEN, AUSGEHEND VON β–CATENIN, SEINE HERSTELLUNG UND SEINE VERWENDUNG

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Mittel zur Therapie von menschlichen Erkrankungen auf der Basis von Substanzen, die die Interaktion von β-Catenin mit Transkriptionsfaktoren und Tumorsuppressor-Genprodukten beeinflussen. Darunter befinden sich von LEF-1-/TCF-4-Transkriptionsfaktoren und von β-Catenin abgeleitete Peptide und ähnliche Moleküle.
Sie betrifft ferner ein Verfahren zur Auffindung solcher Substanzen sowie die Anwendung des Mittels, bevorzugt für die Therapie von Tumoren wie Kolonkarzinomen und Melanomen.
Anwendungsgebiete der Erfindung sind demzufolge die pharmazeutische Industrie und die Medizin.

β-Catenin ist ein zytoplasmisches Protein mit verschiedenen Funktionen in der Zelle. Im Komplex mit den Zelladhäsionsmolekülen der Cadherin-Familie stellt β-Catenin die Verbindung zum Zytoskelett her (Hülsken, J. et al., E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. J-Cell-Biol. 127: 2061-9, 1994). Zusätzlich ist β-Catenin eine Komponente der Wnt-Signaltransduktion, die in der Embryonalentwicklung eine große Rolle spielt. Der Transkriptionsfaktor LEF-1 wurde als Interaktionspartner von β-Catenin in dieser Signalkaskade indentifiziert (Behrens, J. et al., Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. Nature, 382: 638-42, 1996). Der Mechanismus der Signaltransduktion durch β-Catenin und LEF-1 ist geklärt: Er besteht in dem durch LEF-1 vermittelten Transport von β-Catenin in den Zellkern. Im Zellkern reguliert dieser Komplex die Genexpression durch die im Komplex veränderte, LEF-1 induzierte DNA-Biegung und durch die carboxy-terminale Transaktivierungsdomäne von β-Catenin. Inzwischen wurde gezeigt, daß auch andere Mitglieder der LEF-1/TCF-Familie von Transkriptionsfaktoren, z.B. TCF-4 diese Signaltransduktion vermitteln können (Korinek, V. et al., Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. Science, 275: 1784-87, 1997).
Voraussetzung für diese β-Catenin-abhängige Signaltransduktion ist die Stabilisierung des zytoplasmatischen Pools von freiem, nicht Cadherin-gebundenem β-Catenin. Dieser Pool wird durch die Glykogen-Synthetase-Kinase 3β, durch das Tumorsuppressor-Genprodukt APC sowie durch Conductin/Axin negativ reguliert.

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

Für Karzinome und Melanome wurde gezeigt, daß Mutationen im N-Terminus von β-Catenin oder in der β-Catenin-Bindungsdomäne von APC diese Regulation aufheben (Morin, P.J. et al., Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. Science, 275: 1787-90, 1997). Als Konsequenz wird der β-Catenin-Pool stabilisiert. In Melanomen führt diese Stabilisierung zur LEF-1 vermittelten Translokation von β-Catenin in den Zellkern, während in Kolonkarzinomen vor allem TCF-4 diese Funktion erfüllt. Die transkriptionelle Aktivität des Komplexes in Karzinom-Zellinien wurde durch die Aktivierung eines Reportergens belegt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß diese Aktivität in APC-defizienten Kolonkarzinom-Zellinien nach Wiedereinführung von APC inhibiert wurde.
APC-Mutationen wurden in der überwiegenden Mehrheit von Kolonkarzinomen identifiziert, während nicht APC-defiziente Tumore Mutationen im β-Catenin-Gen aufweisen. Das Resultat dieser Mutationen von APC oder β-Catenin ist die Aktivierung der Signaltransduktion durch den β-Catenin-LEF/TCF-Komplex. Es unterstreicht die Schlüsselrolle von β-Catenin in der Tumorentstehung. Da APC-Mutationen als ein frühes Ereignis in der Enstehung von Kolontumoren identifiziert wurden, ist die Aktivierung des β-Catenin-LEF/TCF-Komplexes wahrscheinlich ein zentraler Schritt in der Tumorentstehung.

Es wurde bereits versucht, die Schlüsselrolle von β-Catenin in der Tumorentstehung für die Entwicklung von Tumortherapeutika auszunutzen. Nahezu zeitgleich wurden in den USA zwei Patentanmeldungen vorgenommen, die inzwischen als WO-Schriften veröffentlicht wurden. In WO 98/41631 (John Hopkins Universität - B. Vogelstein) wird die Beeinflussung von Interaktionen von β-Catenin, TCF-4 und dem Tumorsuppressor-Protein APC mit dem Ziel der Verhinderung von Krebsentstehung beansprucht. Dabei wurde gezeigt, daß Produkte von mutierten APC-Genen, die in Kolorektal-Tumoren nachgewiesen wurden, die β-Catenin/TCF-4-Transkriptionsaktivierung nicht mehr regulieren können. Weiterhin weisen Kolorektal-Tumore mit intakten APC-Genen Aktivierungsmutationen von β-Catenin im N-Terminus auf, was die Funktion der wichtigen Phosphorylierungsorte beeinflußt. Daraus wird abgeleitet, daß die Regulierung von β-Catenin für den Tumorsuppressorwirkung von APC kritisch ist und daß diese Regulierung durch Mutationen in APC oder in β-Catenin umgangen werden kann. Der Hauptanspruch betrifft das intronfreie DNA-Molekül, welches für TCF-4 kodiert.
WO 98/42296 (Onyx Pharmaceuticals Inc. - Rubinfeld) betrifft Zusammensetzungen und Methoden zur Diagnose und zur Behandlung von Krankheiten, die durch β-Catenin/Transkriptionsfaktor-Interaktionen ausgelöst werden. Der Hauptanspruch betrifft das isolierte, stabilisierte β-Catenin und seine Fragmente, solche Fragmente sind allerdings nicht angegeben worden.

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

Die hier beschriebene Erfindung hat zum einen das Ziel, neue Mittel zur Behandlung von Karzinomen bzw. aberranter Gewebs- und Organentwicklung zur Verfügung zu stellen. Ihr liegt die spezielle Aufgabe zugrunde, die Interaktion von β-Catenin mit LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren als Voraussetzung der Translokation und der Aktivität des Komplexes im Zellkern zu beeinflussen. Diese Modulation soll spezifisch sein, d.h. darf mit anderen Interaktionen von β-Catenin (z.B. mit APC, Conductin oder E-cadherin) nicht interferieren. Ein Ziel der Erfindung besteht außerdem darin, ELISA-Verfahren zur Durchmusterung von Substanzbibliotheken zur Auffindung von Molekülen (u. a. Peptiden, organischen Verbindungen) zu entwickeln, die hochspezifisch nur jeweils eine Interaktion des β-Catenin beeinflussen.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

In der ersten Realisierung der Erfindung wurden die Bindungsdomänen der LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren für β-Catenin identifiziert (Abb.1). Sie sind Ausgangspunkt für die Gewinnung der erfindungsgemäßen Peptide und ähnlicher Moleküle. Diese Peptide bestehen bevorzugt aus 10-20 Aminosäuren langen Sequenzen aus dem N-terminalen Bereich von LEF-1 bzw. TCF-4 (Abb.2). Besonders bevorzugt sind es die Peptide

- bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren 11-34 von LEF-1 (Abb.1) folgender Sequenz
GDPELCATDEMIPFKDEGDPQKEK

- bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren 14-27 von LEF-1 folgender Sequenz
ELCATDEMIPFKDE

- bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren 7-29 von TCF-4 (Abb.2) folgender Sequenz
GGDDLGANDELISFKDEGEQEEK

- bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren 10-23 von TCF-4 folgender Sequenz
DLGANDELISFKDE

Bevorzugt sind ferner Peptide, in denen die sauren Aminosäuren im Abstand von 5 Aminosäuren angeordnet und durch hydrophobe und basische Aminosäuren flankiert sind (Abb.2).

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

Diese Peptide können gemäß der Erfindung für die Tumortherapie eingesetzt werden, wofür zwei prinzipielle Wege möglich sind.

a) Verwendung der Peptide als solche

Ein direkter Einsatz der Peptide für die Behandlung von Tumoren kommt wegen ihrer Instabilität gegenüber Proteasen und wegen des Mangels an Membranpermeabilität im allgemeinen nicht in Betracht. Eine Stabilisierung erfolgt durch Kopplung mit einem zweiten Peptid, wofür das sog. Antennapedia-Peptid RQIEIWFQNRRMEWEE hervorragend geeignet ist. Dieses Peptid ist in der Lage, bis zu 100 Aminosäuren lange angekoppelte Peptide durch Zellmembranen in das Zytoplasma und den Zellkern zu transportieren. Die gekoppelten Peptide können vorteilhaft in der Tumortherapie eingesetzt werden.

b) Verwendung der Peptide zum Drugdesign (Peptidmimikry).

Die erfindungsgemäßen Peptide dienen auch als Grundlage zum Design von Substanzen, die durch gezielte Modifikation die Stabilität und Wirksamkeit in der Zelle erhöhen ('Peptidomimetics'). Beispielsweise kann das durch Einführen reaktiver Gruppen, Austausch von Aminosäuren oder Einführung nichthydrolysierbarer peptidähnlicher Bindungen erfolgen.

Durch den Austausch des Kohlenstoffgerüstes der Peptide gegen synthetische Kohlenstoffgerüste mit gleicher Anordnung von funktionellen Gruppen kann die Stabilität der Moleküle ebenfalls erhöht werden (Non-Peptidomimetics). Dieses molekulare Mimikry der biologischen Aktivität der von der minimalen Bindungsdomäne von LEF-1/TCF für β-Catenin abgeleiteten inhibitorischen Peptide (Abb.3 und 4) ermöglicht die Produktion potenterer Wirkstoffe für die Tumortherapie.

In einem zweiten Schritt zur Realisierung der Erfindung wurden die Regionen von β-Catenin identifiziert, die für die spezifischen Bindungen zu LEF-1/TCF-4, APC (20 und 15 Aminosäuren-Repeats enthaltende Domänen), Conductin und E-Cadherin verantwortlich sind. Es wurde gefunden, daß diese Regionen zum Teil überlappen und die Armadillo-Domänen 3-8 von β-Catenin betreffen (Abb.5 und 6). Der Kernpunkt dieses Schritts besteht darin, daß Mutationen von β-Catenin erzeugt wurden, welche spezifische Interaktionen zu einzelnen Partnern verhindern. Es handelt sich im einzelnen um folgende Mutationen, bezogen auf die in der Anlage beschriebene Teilsequenz von β-Catenin (Tab.1):

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

His 470, Arg 469	Keine Interaktion mit LEF-1/TCF-4
Trp 383	Keine Interaktion mit APC 20aa
Arg 386	Keine Interaktion mit APC 15aa
Phe 253, Arg 274, Trp 338	Keine Interaktion mit Conductin

Damit ist die Möglichkeit gegeben, Peptide und analoge Moleküle zu generieren, die spezifisch die Interaktionen von β-Catenin mit APC, β-Catenin mit Conductin oder β-Catenin mit E-Cadherin hemmen. Diese Moleküle eignen sich ebenso zur Generierung neuer Pharmaka. Dazu werden potentielle Kandidaten für eine cancerostatische Wirksamkeit mit β-Catenin und z. B. LEF-1 unter Bedingungen in Kontakt gebracht (z.B. in einem ELISA), bei denen diese Proteine eine Bindung eingehen. Es wird dann gemessen, in welchem Maße diese Bindung durch die zugesetzte Substanz gehemmt wird.

Die Wnt-Signaltransduktion und ihre Komponenten spielen ebenfalls eine Rolle bei der Entwicklung und Erhaltung von Geweben und Organen, z.B. von bestimmten Regionen des Gehirns, der Extremitäten, der Niere sowie der Haut. Die gewebsspezifische Ausschaltung des β-Catenin-Gens in der Maus zeigt, daß β-Catenin für die Entwicklung der Haut und insbesondere der Haare von Bedeutung ist. Dadurch erstreckt sich die Erfindung auch auf Verfahren der Förderung der Haut- und Haarentwicklung durch erhöhte Expression von β-Catenin (oder von stabilerem β-Catenin). Das kann man beispielsweise durch Inhibition der Interaktion mit APC oder Conductin erreichen.

So können erfindungsgemäß spezifische Inhibitoren der β-Catenin /APC- oder der β-Catenin /Conductin-Interaktion genutzt werden, um in Zellen und Geweben erhöhte β-Catenin–Konzentrationen zu erreichen. Ebenso fördert Conductin, das ein analoges Protein zu Axin ist, den Abbau von β-Catenin. Inhibitoren der β-Catenin/APC-und β-Catenin/Conductin-Interaktion kann eingesetzt werden, um in Organentwicklungsvorgänge einzugreifen. Z.B. könnte so die Haarentwicklung beim Menschen lokal gefördert werden.

Im Einzelnen wurden folgende Untersuchungen durchgeführt.

1. Charakterisierung des minimalen Bindungsdomäne von LEF/TCF für β-Catenin:

Zur Identifizierung der minimalen Bindungsdomäne wurde das 'Hefe-2-Hybrid-System' eingesetzt (Abb.1). Die minimale Bindungsdomäne konnte auf die N-terminalen Aminosäuren 11-27 von LEF-1 begrenzt werden, welches den Aminosäuren 7-29 in TCF-4 entspricht (Abb.2). Die Interaktion von N-terminalen LEF-1 Fragmenten mit β-Catenin wurde anhand der Aktivierung eines lacZ-Reportergens bestimmt (s. Ausführungsbeispiel).

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

Im ELISA mit synthetischen Peptiden wurde gezeigt, daß ensprechende Peptide (11-34, 14-27) die β-Catenin/LEF-1-Komplexbildung spezifisch inhibieren. Analoges gilt für die TCF4 Peptide 7-29 und 10-23 bezüglich der β-Catenin/TCF-4-Komplexbildung (Abb.2).

Die für die Inhibition essentiellen Aminosäuren wurden durch Synthese mutanter Peptide identifiziert (Abb.2). Für die Funktion der Peptide ist eine symmetrische Anordnung von sauren Aminosäuren (Asparaginsäure und Glutaminsäure) im Abstand von 5 Aminosäuren flankiert durch hydrophobe Aminosäuren (Leucin, Isoleucin) und eine basische Aminosäure (Lys) wesentlich. Der Austausch von Phenylalanin oder Lysin durch Alanin hebt die Inhibition durch das Peptid ebenfalls auf. Die Bedeutung der sauren und aromatischen Aminosäurereste wurde im Kontext des gesamten LEF-1 Moleküls durch einen Kern-Translokationstest (Abb.4) von endogenem β-Catenin und durch einen Transaktivierungstest in Säugerzellen bestätigt.

2) Charakterisierung der Interaktionsdomäne von β-Catenin für LEF-1, APC, Conductin und E-Cadherin.

Die Armadillo-Region von β-Catenin wurde von Huber et al. 1997 kristallisiert und durch Röntgen-Kristall-Strukturanalyse charakterisiert.. Eine basische Grube konnte identifiziert werden, die für die Interaktion mit den sauren Aminosäuren von LEF-1 (siehe oben) verantwortlich sein könnte. Es wurden deshalb basische (Lys, Arg, His) sowie einige aromatische (Trp) Aminosäuren in den Armadillo-Wiederholungseinheiten 3-9 von β-Catenin mutiert (Abb.5). Es wurde darauf geachtet, daß vor allem freie Aminosäurereste der Helices 3, die die Basis der Grube bilden, sowie einige Aminosäurereste des einen Randes (Helix 1) mutiert wurden. Die mutanten β-Catenine wurden darauf getestet, ob sie noch mit den Interaktionspartnern LEF/TCF, APC, Conductin und E-Cadherin interagieren (Tab.2). Durch dieses Verfahren konnten kritische Aminosäurereste von β-Catenin identifiziert werden, die für spezifische Interaktionen von Bedeutung sind (Abb.5 und 6). Es ist dadurch gelungen, spezifische Regionen von β-Catenin für die einzelnen Interaktionspartner zu identifizieren (Abb.6). Diese Regionen sind für die Identifizierung von Molekülen wichtig, welche spezifisch die Interaktion von β-Catenin für LEF-1, APC, Conductin oder E-cadherin beeinflussen.

Der Befund, daß die Bindungsdomänen von β-Catenin mit LEF-1/TCF, APC, Conductin und E-Cadherin partiell überlappen, ist essentiell für die Selektion neuer Therapeutika. Die Selektion wird z.B. folgendermaßen durchgeführt: Es werden Substanzbibliotheken darauf getestet, ob sie spezifisch die Interaktion von β-Catenin mit LEF-1/TCF, von β-Catenin mit APC (20 oder 15 Aminosäure-Repeats), von β-Catenin mit Conductin oder von β-

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

Catenin mit E-Cadherin beeinflussen. Im weiteren werden Peptide oder ähnliche Oberflächenstrukturen der Armadillo-Region 3-8 von β-Catenin generiert, die durch Mutation von β-Catenin identifiziert wurden, und diese werden anschließend auf ihre Wirkung auf die Bindung der verschiedenen Interaktionspartner getestet.

Die Interaktion mit LEF-1/TCF-4 ist onkogener Natur, d.h. fördert potentiell die Krebsentstehung, die Interaktionen mit APC, Conductin und E-Cadherin sind potentiell anti-onkogen, d.h. sie inhibieren die Krebsentstehung. Jede neue Substanz, die in den Wnt-Signalweg eingreift, muß deshalb sorgfältig auf ihre spezifische Wirkung getestet werden. Die hier vorgestellte Charakterisierung der Bindungsdomäne von β-Catenin stellt dafür die Grundlage dar. Substanzen, die spezifisch die β-Catenin/LEF-1/TCF-4-Interaktion vermindern, sind deshalb potentielle Anti-Krebs-Therapeutika. Substanzen, die die Interaktion zu APC, Conductin oder E-Cadherin hemmen, fördern potentiell den Wnt-Signalweg und können zur verstärkten Gewebeentwicklung, z.B. zur Förderung des Haarwuchses eingesetzt werden.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

1. Identifizierung der minimalen Bindungsdomäne von LEF-1 für β-Catenin:

Die Interaktion von Teildomänen von LEF-1 mit β-Catenin wurde im Hefe-2-Hybrid System durch Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität nach Angaben des Herstellers (Clontech) analysiert (Abb.1). Für diesen Zweck wurde die für die N-terminalen Teildomänen von LEF-1 kodierende DNA in die Klonierungsstelle des Lex-A DNA-Bindungsdomäne enthaltenden Vektors BTM116 inseriert und durch Sequenzierung überprüft. Die DNA-Fragmente von LEF-1 wurden durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Inkubation mit Restriktionsendonukleasen hergestellt. Die β-Catenin kodierende DNA wurde in den Vektor pGAD424 (Clontech) für die Aktivierungsdomäne von GAL-4 kloniert (Behrens et al. 1996). Für den Vergleich der Interaktion der Hybride wurden die β-Galaktosidase-Aktivitäten unabhängiger Experimente gemittelt.

Die Spezifität der Interaktion der LEF-1-Hybride mit β-Catenin wurde anhand der β-Galaktosidase-Aktivität von Hefen, die die LEF-Hybride und die GAL-4 Aktivierungsdomäne ohne β-Catenin herstellten, kontrolliert (Abb.1). Die Expression der LEF-1 Hybride wurde im Immunoblot mit Hefezell-Lysaten durch Antikörper (Clontech) gegen die Lex-A-Domäne der Hybride kontrolliert. Für die Herstellung der Lysate wurden gleiche Hefemengen nach Bestimmung der optischen Dichte der Kulturen eingesetzt.

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

2. Charakterisierung der β-Catenin Bindungsdomäne von LEF-1 im Test auf den Kerntransport.

Durch in vitro Mutagenese der cDNA von LEF-1 wurden Punktmutationen in der Bindungsdomäne von LEF-1 für β-Catenin eingeführt. Die Mutagenese erfolgte mit dem "Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit" der Firma Clontech nach Angaben des Herstellers. Folgende Aminosäuren wurden durch Alanin substituiert: Glu 14, Asp 19, Glu 20, Phe 24, Lys 25, Asp 26 und Glu 27. Die Mutatanten wurden durch Sequenzierung überprüft und in den Vektor pCG-LEF-1 (Behrens et al. 1996) kloniert. Nach Transfektion von MDCK-Zellen mit LEF-1 oder seinen Mutanten, wurde die Translokation von endogenem β-Catenin in den Zellkern mit immuncytologischen Methoden analysiert. Hierfür wurden je 2.5 x 10^5 MDCK-Zellen mit pCG-LEF-1 transfiziert. Die Immunodetektion von LEF-1 erfolgte mit Anti LEF-1 Serum aus Kaninchen und Cy2-konjugierten Anti-Kaninchen Antikörpern, die Detektion von β-Catenin erfolgte mit monoklonalen Antikörpern und Cy3-konjugierten Anti-Maus Antikörpern (Abb.4A).

3. Charakterisierung und Quantifizierung inhibitorischer Peptide im ELISA:

Für die Quantifizierung der Inhibition der LEF-1/β-Catenin Interaktion durch synthetische Peptide wurden beide Proteine in Bakterien rekombinant mit N-terminalen Histidin-Sequenzen hergestellt und durch Nickel-Chromatographie gereinigt (Behrens et al. 1996). Die Peptide wurden von der Firma Biosyntan mit dem PSSM-8 Automaten (Shimadzu, Japan) unter Verwendung der Fmoc/But-Strategie hergestellt (E. Atherton und R.C. Sheppard. 1989 IRL Press, Oxford: "Solid phase peptide synthesis - a practical approach"). Ca. 50 ng LEF-1 wurde an den Näpfen von ELISA-Platten für 90 Minuten bei Raumtemperatur adsorbiert. Anschließend wurden die Näpfe mit 5% Magermilch-Pulver in PBS für 16 Stunden bei 4° C abgedeckt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur in PBS mit 50 mM Tris HCl (pH 7.5). Nach dem Waschen der Näpfe mit PBS wurden die Peptidverdünnungen zugegeben. Die Inkubation mit 50-100 ng β-Catenin wurden für 10 Minuten in Gegenwart von 200 mg/ml BSA durchgeführt. Die Komplexbildung von LEF-1 und β-Catenin wurde durch den Antikörper PA2 gegen den Carboxy-Terminus von β-Catenin nachgewiesen (Hülsken et al. 1994). PA2 wurde für 10 Minuten in einer Titerverdünnung von 1:5000 in 3% Magermilchpulver in PBS zugegeben. Nach dem Waschen der Näpfe mit PBS erfolgte die Quantifizierung durch Peroxidase konjugierte Nachweisantikörper (1:2500 in 3% Magermilchpulver in PBS, Dianova) und den Umsatz von o-Phenylendiamin durch photometrische Messung bei 405 nm bestimmt. Die Peptide wurden in Konzentrationen von 100 uM bis 0.3 uM eingesetzt. Zur Kontrolle der Spezifität der Inhibition der Interaktion von LEF-1/β-Catenin wurde β-Catenin in den

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

Näpfen adsorbiert und mit den gleichen Antikörpern in Gegenwart und Abwesenheit der Peptide nachgewiesen (Abb.2 und 3).

Für die Mutationsanalyse der Peptide wurden bei der Synthese die angegebenen Aminosäuren durch Alanin ersetzt. Die Quantifizierung der Inhibition der Komplexbildung von b-Catenin und LEF-1 erfolgte wie bereits beschrieben (Abb.2).

4) Herstellung und Testen von Mutanten von β-Catenin, die die Interaktion zu LEF-1, APC, Conductin oder E-Cadherin modulieren.

Die Mutagenese von β-Catenin in den Armadillo-Repeats 3-8 wurde mit dem "Mutagenese Kit" der Firma Clontech nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt und die Mutanten durch Sequenzierung überprüft (Abb.5). In allen Mutanten wurde die ursprüngliche Aminosäure durch Alanin substituiert. Für die Analyse der Interaktionen wurde die für die Aminosäuren Leu218-Leu781 kodierende cDNA von humanen β-Catenin (Armadillo-Repeat 3 bis zum C-terminalen Ende des Proteins) oder seinen Mutanten in den Fusionsvektor für die Aktivierungsdomäne von Gal-4 (pGAD424, Clontech) kloniert. Die cDNA für die Bindungsdomänen der Interaktionspartner wurde in den LexA-Fusionsvektor BTM116 kloniert. Hierfür wurde die cDNA von LEF-1 für die Aminosäuren 1-99, von Conductin für die Aminosäuren Ala342-Arg465, von humanen APC für die Aminosäuren His1012-Glu1215 (APC 15 Aminosäure-Repeats) und für die Aminosäuren Ser1259-Asp1400 (APC 20 Aminosäure-Repeats) und von E-Cadherin für die Aminosäuren Gln773-Asp884 (cytoplasmatische Domäne) mit entsprechenden Primern PCR amplifiziert. Die Interaktion der Lex-A-Hybride mit β-Catenin und seinen Mutanten wurde anhand der β-Galaktosidase- Reporteraktivität im Hefe 2-Hybrid System (Protokoll: "Matchmaker", Clontech) quantifiziert (Tab.2 und Abb.6).

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

Legenden zu den Abbildungen und Tabellen:

Abb.1:
Identifizierung der minimalen Bindungsdomäne von LEF-1 für β-Catenin.

Die Interaktion von Teilen der Bindungsdomäne von LEF-1 mit β-Catenin wurde anhand der β-Galaktosidase-Reporteraktivität im Hefe-2-Hybrid System analysiert. Deletion C-terminaler Aminosäuren von LEF-1 bis zum Glu27 und N-terminaler Aminosäuren bis zum Gly10 führt zu keinem Verlust der Bindung (11-27), während weitere Deletionen die Interaktion verhindern (11-23, 17-34). Die minimale Bindungsdomäne von LEF-1 für β-Catenin besteht demnach aus 17 Aminosäuren (11-27) und weist einen sauren Charakter auf. Die Teildomäne von LEF-1 aus Met 21 bis Val 56 zeigt keine Bindungsaktivität zu β-Catenin.

Abb. 2:
Charakterisierung der minimalen Bindungsdomäne von TCF-4 durch Inhibition der Bindung von β-Catenin an LEF-1 im ELISA.

Synthetische Peptide aus dem N-Terminus von hTCF-4 mit Substitutionen für die angegebenen Aminosäurereste wurden auf ihre Fähigkeit getestet, die Interaktion von LEF-1 mit β-Catenin zu inhibieren. Substitution der sauren Aminosäurereste von Asp10, Asp15 und Asp22 von TCF-4 durch Alanin führt zur Aufhebung der Inhibition durch die entsprechen Peptide. Substitution von Phe20 und Lys21 hat die gleiche Wirkung. Durch Deletion wurde eine saure, minimale Bindungsdomäne von TCF-4 für β-Catenin von 14 Aminosäuren Länge (Asp10 bis Glu23) identifiziert .

Abb. 3:
Inhibition der Interaktion von LEF-1 und β-Catenin durch synthetische Peptide aus der minimalen Bindungsdomäne von LEF-1 im ELISA

Das synthetische Peptid aus der minimalen Bindungsdomäne von LEF-1 (10-34) hemmt die Interaktion von LEF-1 und β-Catenin im ELISA. Eine Reduktion der Komplexbildung auf 50% wird bei einer Peptid-Konzentration von 4 μM gemessen,. während ein Peptid von LEF-1 mit den Aminosäuren Ile35-Val56 die Komplexbildung nicht hemmt.

Abb. 4:
Substitution saurer Aminosäure-Reste und von Phenylalanin in der minimalen Bindungsdomäne von LEF-1 blockiert die Translokation von β-Catenin in den Zellkern.

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

A. MDCK-Zellen wurden mit Wildtyp- und Mutanten von LEF-1 transfiziert und die Translokation von endogenem β-Catenin in den Zellkern durch Immunfluoreszensnachweis überprüft. Substitution der sauren Aminosäure-Reste von Asp19, Glu20, Asp26 und Glu27 durch Alanin blockiert die Translokation von β-Catenin in den Zellkern; die Substitution der aromatischen Aminosäure Phe24 hat den gleichen Effekt. Die Substitution von Glu14 und Lys25 verhindert die Translokation nicht. Pfeile markieren die LEF-1 transfizierten Zellen in der Immunodetektion für endogenes β-Catenin.
B. Vergleich der minimalen Bindungs-Domänen von LEF-1 und TCF-4 mit den entsprechenden Positionen der Aminosäuren.

Abb. 5:
Mutationen zu Alanin in der Armadillo-Domäne von β-Catenin, die zu einer Reduktion von mehr als 70%- der Interaktion mit LEF-1, APC, Conductin und E-Cadherin führen.

Die Lokalisation der Mutationen in Bezug zum strukturellen Kontext (Helix 1-3, in Rahmen) ist dargestellt. Die Zahlen über den Aminosäuren in der Sequenz kennzeichnen die analysierten Mutanten. Farblich markiert sind die Mutanten mit mehr als 70%-Reduktion in der Interaktion für LEF-1 (rot), APC (blau), Conductin (grün) und E-Cadherin (gelb). Grau unterlegte Aminosäuren stellen in allen Repeats konservierte identische und chemisch ähnliche Aminosäuren dar.

Abb.6:
Mutationen in der Armadillo-Domäne von β-Catenin, die spezifisch nur die Bindung von LEF-1, APC, Conductin oder E-Cadherin verhindern.

Darstellung der Armadillo-Domäne Repeats 3-8 mit Mutationen, die eine Reduktion der jeweiligen Interaktion auf weniger als 30% (rot) oder auf 30-60% (gelb) aufweisen. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind die Mutanten, die für die jeweilige Interaktion spezifisch sind: Arg469 und His470 für die Bindung von LEF-1, Trp383 für APC (20 Aminosäure-Repeats), Arg386 für APC (15 Aminosäure-Repeats), Phe253,Arg274 und Trp338 für Conductin. Die Interaktionen wurden im Hefe 2-Hybrid System anhand der β-Galaktosidase-Reporteraktivität bestimmt.

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

Tab.1:
Aminosäuresequenz der Armadillo-Repeats 3-8 von humanen β-Catenin

Tab.2:
Zusammenstellung aller β-Catenin-Mutanten mit weniger als 60% Bindungsaktivität zu den angegebenen Bindungsdomänen von LEF-1, APC, Conductin und E-Cadherin.

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

BNSDOCID: <WO___9942481A2_1_>

Tab.1

Aminosäuresequenz des humanen β-Catenin (Armadillo-Repeats 3-8)

arm	3	(224-264)	HREGLLAIFKSGGIPALVKMLGSPVDSVLFYAITTLHNLLL
arm	4	(265-306)	HQEGA MAVRLAGGLQKMVALLNKTNVKFLAITTDCLQILAY
arm	5	(307-349)	GNQESKLIILASGGPQALVNIMRTYTYEKLLWTTSRVLKVLSV
arm	6	(350-390)	CSSNKPAIVEAGGMQALGLHLTDPSQRLVQNCLWTLRNLSD
arm	7	(391-429)	AATKQEGMEGLLGTLVQLLGSDDINVVTCAAGILSNLTC
arm	8	(430-473)	NNYKNKMMVCQVGGIEALVRTVLRAGDREDITEPAICALRHLTS

BERICHTIGTES BLATT (REGEL 91)
ISA / EP

Tab.2
Interaktion von β-Catenin-Mutanten mit LEF-1, APC (20 und 15 Aminosäure -Repeats), Conductin und E-Cadherin

β-Catenin Mutanten	arm. Einh.	Interaktion mit				
		LEF-1	APC-20	APC-15	Conductin	E-Cadherin
Phe 253	3	-	40	-	17	-
His 260	3	53	37	-	1	-
Arg 274	4	-	40	-	29	50
Lys 292	4	-	28	-	5	-
Trp 338	5	-	55	-	20	-
Arg 342	5	-	29	-	20	41
Lys 345	5	38	0	-	22	27
Lys 354	6	38	-	54	43	40
Trp 383	6	-	0	59	-	-
Arg 386	6	35		12	45	-
Lys 394	7	-	-	-	42	-
Lys 435	8	-	-	30	42	-
Arg 457	8	-	-	-	36	-
Arg 469	8	17	-	-	-	50
His 470	8	2	47	60	-	-

Die Werte geben den prozentualen Anteil der jeweiligen Interaktion mit Wildtyp-β-Catenin an. Durch - gekennzeichnete Interaktionen entsprechen 60 -100 % der Wildtyp-Interaktion. Die Werte wurden in Hefe 2-Hybrid-Assays ermittelt.

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

Patentansprüche

1. Mittel zur Therapie von menschlichen Erkrankungen auf der Basis von Substanzen, die die Interaktion von β-Catenin mit Transkriptionsfaktoren und Tumorsuppressor-Genprodukten beeinflussen.

2. Mittel zur Therapie von menschlichen Erkrankungen auf der Basis von Substanzen, die die Interaktion von β-Catenin mit Transkriptionsfaktoren und Tumorsuppressor-Genprodukten hemmen.

3. Mittel zur Therapie von menschlichen Erkrankungen auf der Basis von Substanzen, die die Interaktion von β-Catenin mit Transkriptionsfaktoren und Tumorsuppressor-Genprodukten fördern.

4. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Interaktion von β-Catenin mit LEF-1 beeinflußt.

5. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Interaktion von β-Catenin mit TCF-4 beeinflußt.

6. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Interaktion von β-Catenin mit APC 15 bzw. AP 20 Aminosäure-Repeats beeinflußt.

7. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Interaktion von β-Catenin mit Conductin beeinflußt.

8. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Interaktion von β-Catenin mit E-Cadherin beeinflußt.

9. Peptide, die Teile der LEF-1-/TCF-4-Transkriptionsfaktoren umfassen, und ihre Varianten und Mutanten.

10. Peptid nach Anspruch 9, bestehend aus 10-40 Aminosäuren langen Sequenzen aus dem N-terminalen Bereich von LEF-1 bzw. TCF-4.

11. Peptid nach Anspruch 9-10, bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren 11-34 von LEF-1 folgender Sequenz
GDPELCATDEMIPFKDEGDPQKEK

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

12. Peptid nach Anspruch 9-10, bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren 14-27 von LEF-1 folgender Sequenz
ELCATDEMIPFKDE

13. Peptid nach Anspruch 9-10, bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren 7-29 von TCF-4 folgender Sequenz
GGDDLGANDELISFKDEGEQEEK

14. Peptid nach Anspruch 9-10, bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren 10-23 von TCF-4 folgender Sequenz DLGANDELISFKDE

15. Peptid nach Anspruch 9-14, dadurch gekennzeichnet, daß sie saure Aminosäuren im Abstand von 5 Aminosäuren, die durch hydrophobe Aminosäuren flankiert sind, und eine basische Aminosäure enthalten.

16. Verwendung der Peptide gemäß Anspruch 9-15 zur Tumortherapie,
dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide mit einem zweiten Peptid gekoppelt und danach in geeigneter Form appliziert werden.

17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß als zweites Peptid das Antennapediapeptid RQIEIWFQNRRMEWEE eingesetzt wird.

18. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide und Bindungsregionen zur Erhöhung der Stabilität modifiziert werden (Peptidomimetics)

19. Verwendung der Peptide und Bindungsregionen gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß ihr Kohlenstoffgerüst gegen Kohlenstoffgerüste mit gleicher Anordnung von funktionellen Gruppen ausgetauscht wird (Non Peptidomimetics).

20. Peptide und ähnliche Moleküle aus der Armadillo-Domäne (arm-Einheiten 3-8) von β-Catenin (Sequenz gemäß Anlage: Tabelle 1) und die Mutanten im Kontext des gesammten β-Catenin-Moleküls , die mindestens eine der spezifischen Interaktionsdomänen zu LEF-1, TCF-4, APC, Conductin oder E-Cadherin umfassen.

21. Peptide und Bindungsregionen von β-Catenin nach Anspruch 20, die den Bereich von His 470 und/oder Arg 469 sowie Fragmente davon umfassen (LEF-1/TCF-Bindungsstelle).

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

22. β-Catenin Mutanten nach Anspruch 20 mit der Mutation His 470 und/oder Arg 469.

23. Peptide und Bindungsregionen von β-Catenin, die den Bereich von Trp 383 sowie Fragmente davon umfassen (APC-Bindungsstelle, 20 Aminosäure-Repeat).

24. β-Catenin Mutanten nach Anspruch 20 mit der Mutation Trp 383.

25. Peptide und Bindungsregionen von β-Catenin nach Anspruch 20, die den Bereich von Arg 386 sowie Fragmente davon umfassen (APC-Bindungsstelle, 15 Aminosäure-Repeat).

26. β-Catenin Mutanten nach Anspruch 20 mit der Mutation Arg 386.

27. Peptide und Bindungsregionen von β-Catenin nach Anspruch 20, die den Bereich von Arg 386, Phe 253, Arg 274, Trp 338 sowie Fragmente davon umfassen (Conductin-Bindungsstelle)

28. β-Catenin Mutanten nach Anspruch 20 mit einer oder Kombinationen von folgenden Mutationen: Arg 386, Phe 253, Arg 274, Trp 338

29. Verwendung von Substanzen, die durch Peptidomimetics oder Non-Peptidomimetics aus den Ansprüchen 20-28 gewonnen werden.

30. Verwendung der Peptide und ähnlicher Moleküle nach Anspruch 20-28 zum Aufbau von Mitteln zur Behandlung von Tumoren, Gewebe und Organschäden, z.B. von Haarausfall.

31. Verwendung der Peptide und ähnlicher Moleküle nach Anspruch 20-28 zum Screening von Substanzen, die hochspezifisch eine der Interaktionen von β-Catenin mit LEF/TCF, APC, Conductin oder E-Cadherin hemmen oder verstärken.

32. Verwendung der Peptide und ähnlicher Moleküle nach Anspruch 20-28, die die Interaktion von β-Catenin mit LEF/TCF, APC, Conductin oder E-Cadherin hemmen, zur Tumortherapie.

33. Verwendung der Peptide und ähnlicher Moleküle nach Anspruch 20-28, die die Interaktion von β-Catenin mit LEF/TCF, APC, Conductin oder E-Cadherin fördern, zur Gewebe- und Organ-Regeneration (z.B. Haarwuchsförderung).

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

34. ELISA zur Durchmusterung von Substanzbibliotheken, auf Komponenten hin, die die Interaktion von β-Catenin mit LEF-1/TCF, APC, Conductin und E-Cadherin beeinflussen.

35. ELISA nach Anspruch 35, enhaltend Peptide und Mutanten sowie ähnliche Moleküle nach den Ansprüchen 9-15, 20-28 zur Identifizierung von Substanzen zur Tumortherapie, Gewebe- und Organregeneration.

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

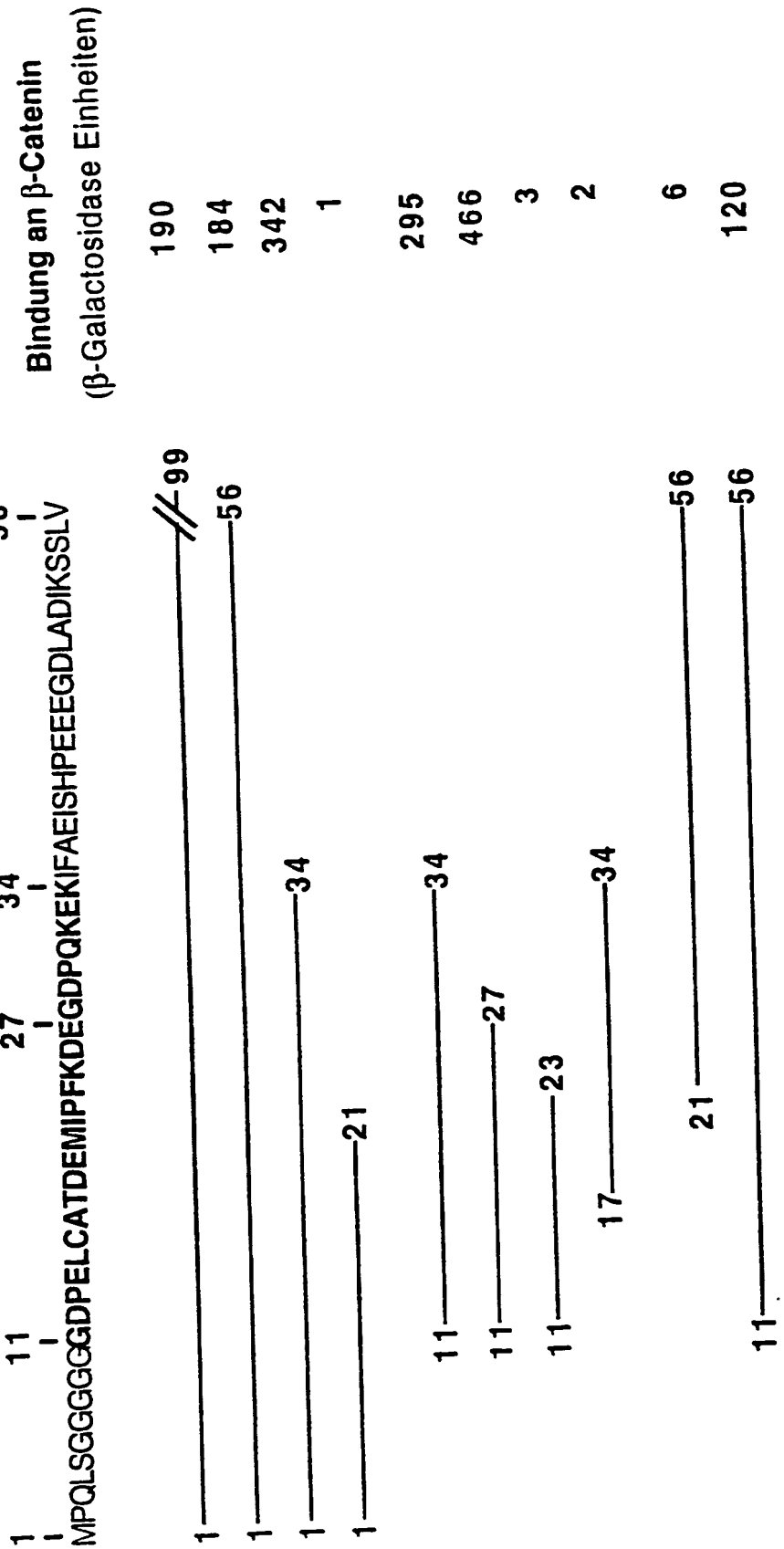


Abb.1

BERICHTIGTES BLATT (REGEL 91)
ISA / EP

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

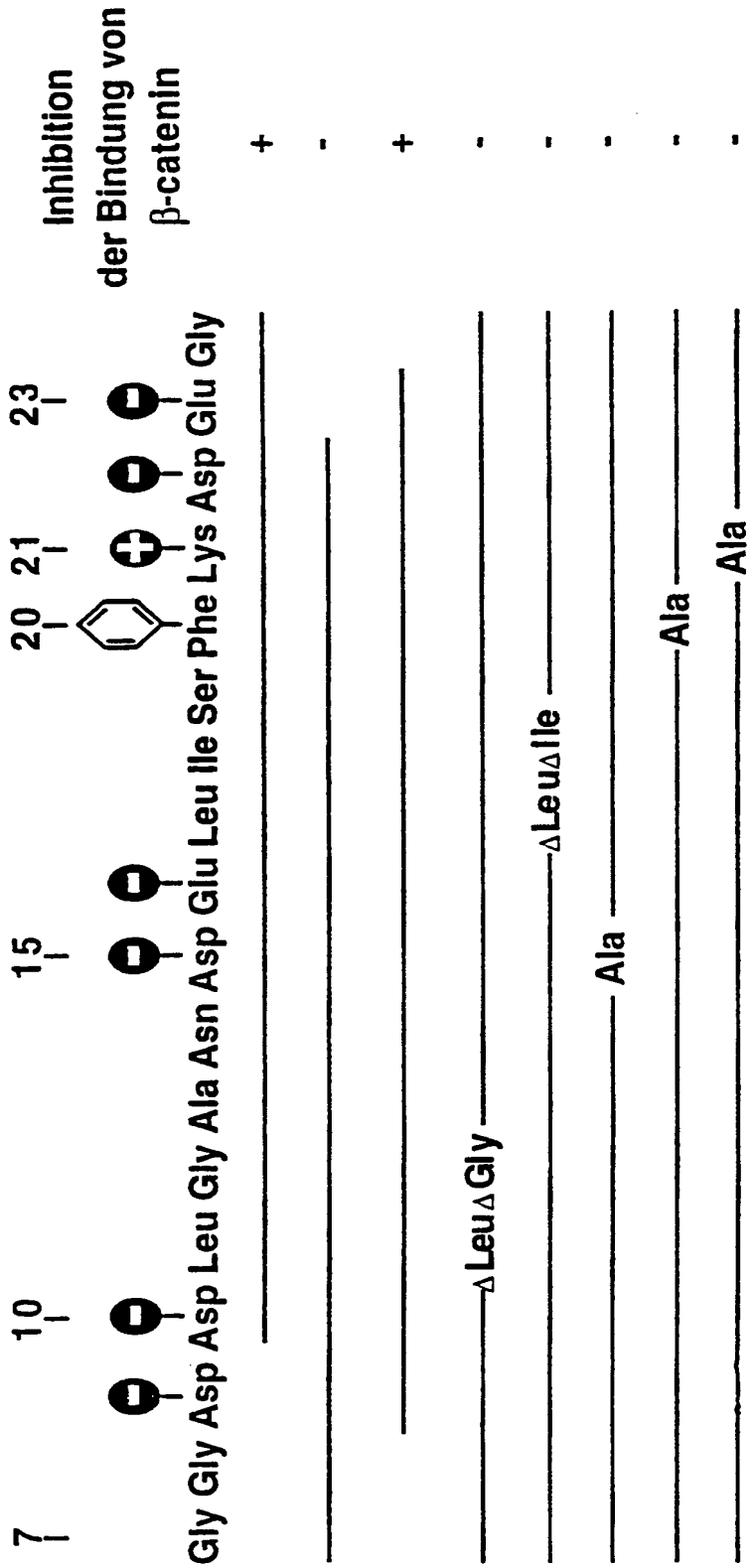


Abb.2

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

Inhibition der LEF-1/β-catenin Interaktion durch synthetische Peptide aus der Minimalen Bindungs-Domäne

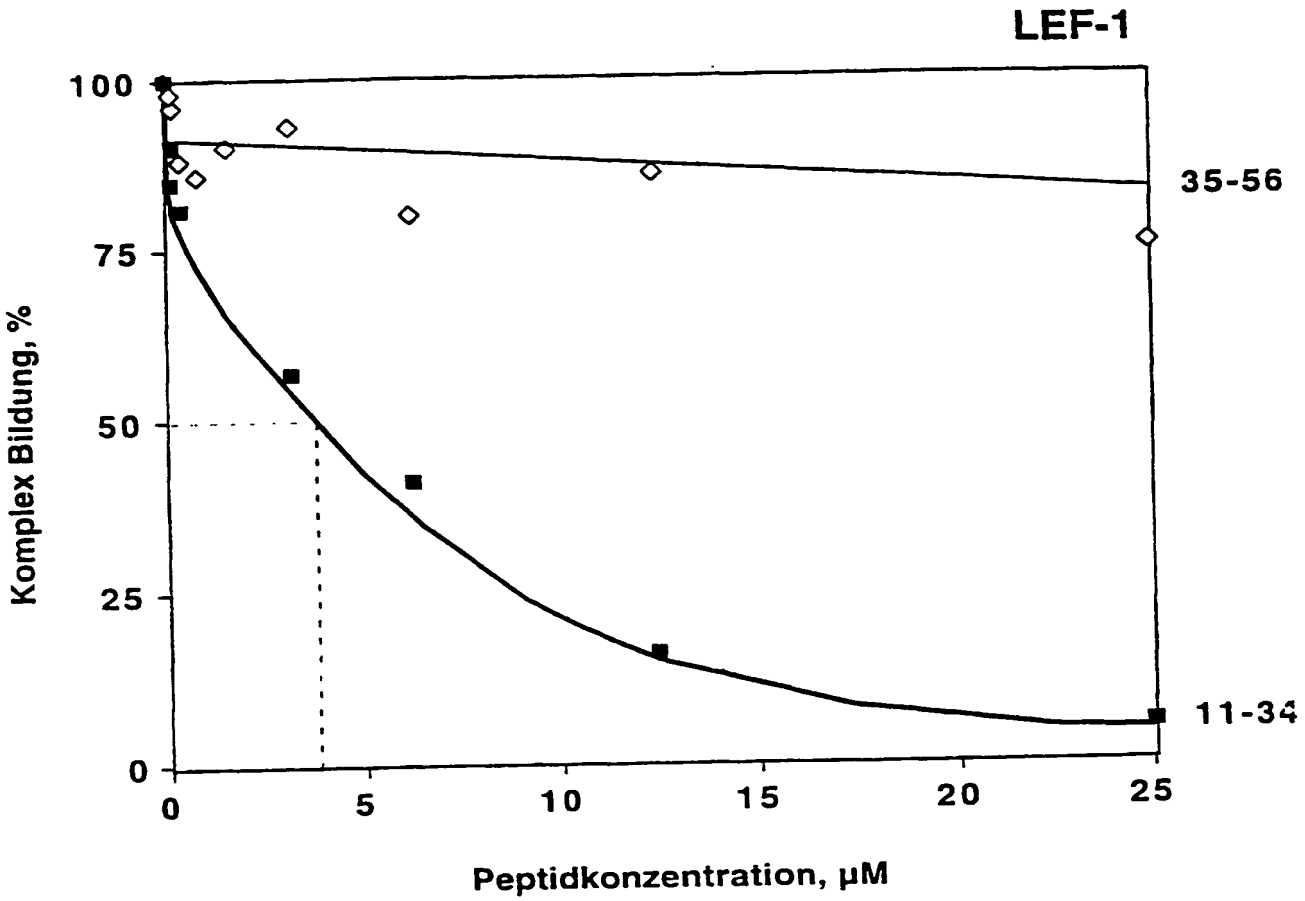


Abb. 3

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

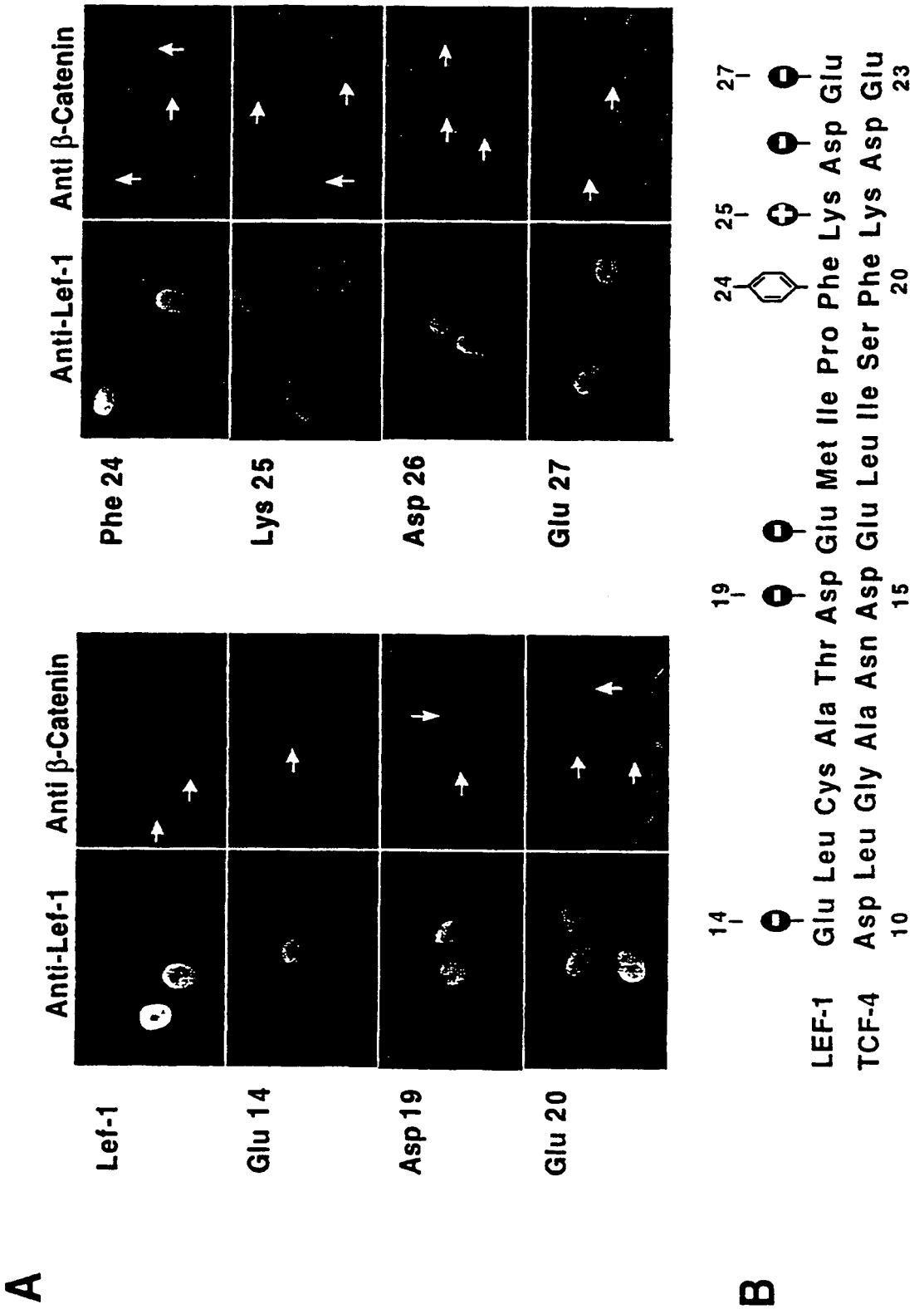
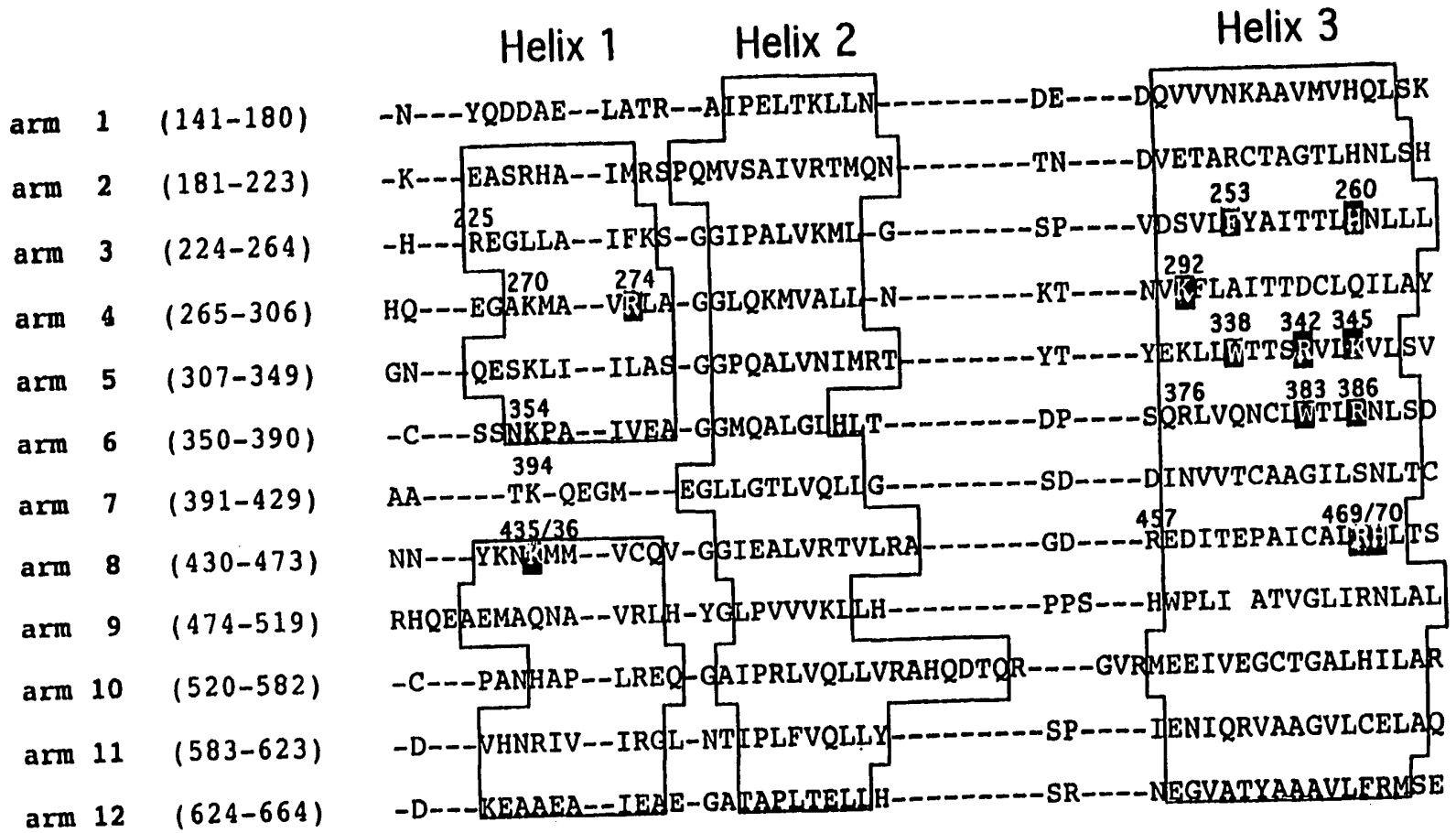


Abb. 4

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

BNSDOCID: <WO___9942481A2_1_>

β-Catenin Mutationen mit < 30 % Transaktivierung



■ LEF-1
■ APC
■ Conductin
E-Cadherin

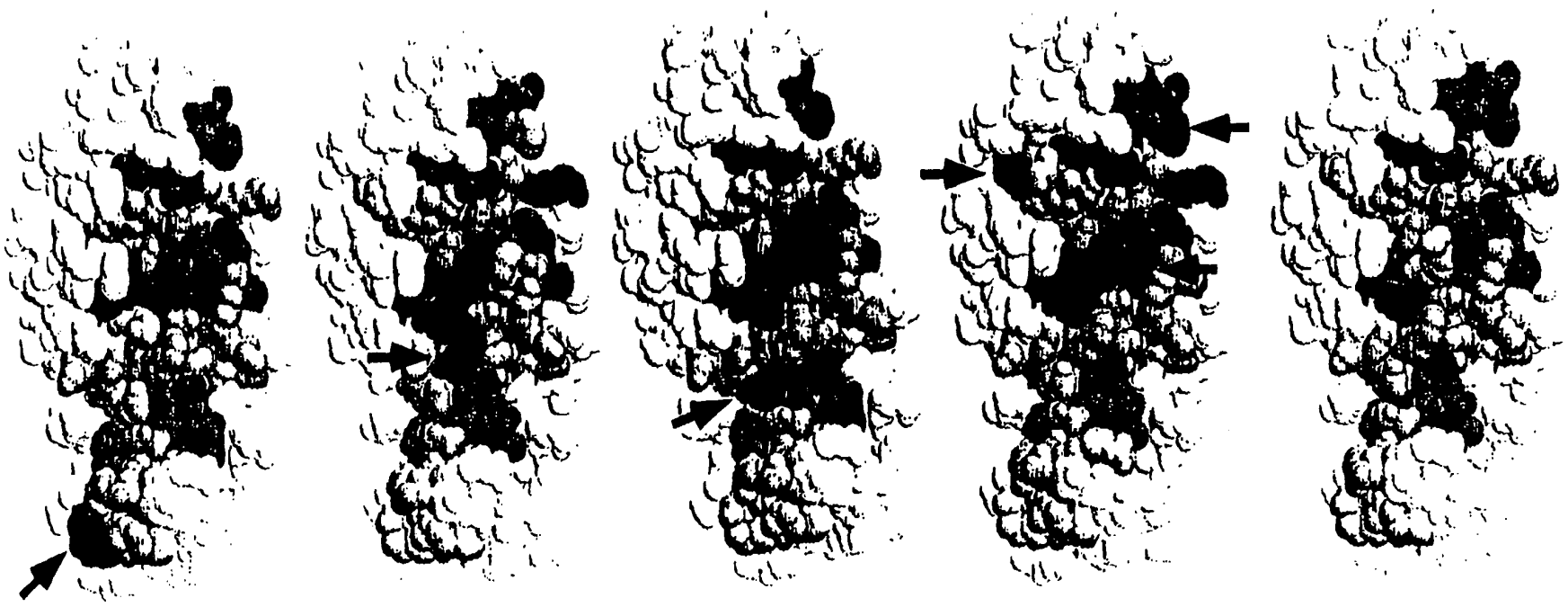
Abb. 5

BERICHTIGTES BLATT (REGEL 91)
ISA / EP

BNSDOCID: <WO___9942481A2_I_>

BERICHTIGTES BLATT (REGEL 91)
ISA / EP

Interaktion von β-Catenin Mutanten mit :



His 470
Arg 469

Trp 383

Arg 386

Phe 253
Arg 274
Trp 338

Interaktions-Reporteraktivität:
0 - 30 %
30- 60 %

: Mutation für Interaktionspartner spezifisch

Abb. 6

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C07K 14/47, 19/00, A61K 38/17, G01N 33/00 — A3

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 99/42481**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. August 1999 (26.08.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/00554

(22) Internationales Anmeldedatum: 22. Februar 1999 (22.02.99)

(30) Prioritätsdaten:
198 07 390.9 21. Februar 1998 (21.02.98) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: BIRCHMEIER, Walter [DE/DE]; Goethestrasse 14, D-16341 Schwanebeck (DE). VON KRIES, Jens-Peter [DE/DE]; Meraner Strasse 49 b, D-16341 Zepernick (DE).

(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 10. Februar 2000 (10.02.00)

(54) Title: AGENTS FOR TREATING HUMAN ILLNESSES BASED ON β-CATENIN, AND THE PRODUCTION AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: MITTEL ZUR THERAPIE VON MENSCHLICHEN ERKRANKUNGEN, AUSGEHEND VON β-CATENIN, SEINE HERSTELLUNG UND SEINE VERWENDUNG

(57) Abstract

β-catenin is a central molecule of the Wnt signal path. Increasing β-catenin in the cell leads to the translocation in the cell nucleus and to the interaction with transcription factors of the LEF-1/TCF family. This can lead to colonic cancers and melenomas (oncogenic signal path). However, β-catenin also interacts with the tumor-suppressor genes APC, conductin and E-cadherin which have a contrary effect on the cell (anti-oncogenic effect). The invention relates to peptides derived from LEF-1-/TCF-4-transcription factors and analogous molecules in the treatment of tumors, especially for treating colonic cancers and melanomas. These peptides and analogous molecules influence the interaction between β-catenin and LEF-1/TCF. The invention can be used in the fields of pharmaceuticals and medicine. The invention essentially relates to peptides, said peptides comprising the parts of the LEF-1/TCF-4-transcription factors, and to the variants and mutations thereof. The peptides are preferably comprised of 10-40 amino acids from the N-terminal area of LEF-1 or TCF-4. The invention also relates to peptides or analogous molecules derived from the armadillo region of β-catenin which were identified as interaction domains with LEF-1/TCF, APC, conductin and E-cadherin. These peptides or analogous molecules can likewise inhibit the interaction between β-catenin and LEF-1/TCF, or in the case of APC or conductin, can increase the concentration of β-catenin in the cell. These last molecules can be used in order to influence the formation of tissue and organs, for example, in order to promote hair growth.

(57) Zusammenfassung

β-Catenin ist ein zentrales Molekül des Wnt-Signalweges. Erhöhung von β-Catenin in der Zelle führt zur Translokation in den Zellkern und zur Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der LEF-1/TCF-Familie. Dies kann zu Kolonkarzinomen und Melanomen führen (onkogener Signalweg). β-Catenin interagiert aber auch mit den Tumorsuppressorgenen APC, Conductin und E-Cadherin, die eine gegenteilige Wirkung auf die Zelle ausüben (anti-onkogene Wirkung). Die Erfindung betrifft von LEF-1-/TCF-4-Transkriptionsfaktoren abgeleitete Peptide und analoge Moleküle in der Tumortherapie, insbesondere zur Behandlung von Kolonkarzinomen und Melanomen. Diese Peptide und analogen Moleküle beeinflussen die Interaktion zwischen β-Catenin und LEF-1/TCF. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die pharmazeutische Industrie und die Medizin. Wesentlicher Teil der Erfindung sind Peptide, die Teile der LEF-1-/TCF-4-Transkriptionsfaktoren umfassen, und ihre Varianten und Mutanten. Sie bestehen vorzugsweise aus 10-40 Aminosäuren aus dem N-terminalen Bereich von LEF-1 bzw. TCF-4. Im weiteren umfaßt die Erfindung Peptide oder analoge Moleküle, abgeleitet aus der Armadillo-Region von β-Catenin, die als Interaktionsdomänen zu LEF-1/TCF, APC, Conductin und E-Cadherin identifiziert wurden. Diese Peptide oder analogen Moleküle können ebenso die Interaktion zwischen β-Catenin und LEF-1/TCF hemmen, oder, wie im Falle von APC oder Conductin, die Konzentration von β-Catenin in der Zelle erhöhen. Diese letzteren Moleküle können zur Beeinflussung von Gewebe- und Organbildung, z.B. zur Förderung des Haarwuchses eingesetzt werden.

BNSDOCID: <WO___9942481A3_I_>

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	**ES**	Spanien	**LS**	Lesotho	**SI**	Slowenien
AM	Armenien	**FI**	Finnland	**LT**	Litauen	**SK**	Slowakei
AT	Österreich	**FR**	Frankreich	**LU**	Luxemburg	**SN**	Senegal
AU	Australien	**GA**	Gabun	**LV**	Lettland	**SZ**	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MC**	Monaco	**TD**	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	**GE**	Georgien	**MD**	Republik Moldau	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagaskar	**TJ**	Tadschikistan
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**MK**	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland			**TR**	Türkei
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	**IE**	Irland	**MN**	Mongolei	**UA**	Ukraine
BR	Brasilien	**IL**	Israel	**MR**	Mauretanien	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Island	**MW**	Malawi	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	**IT**	Italien	**MX**	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**UZ**	Usbekistan
CG	Kongo	**KE**	Kenia	**NL**	Niederlande	**VN**	Vietnam
CH	Schweiz	**KG**	Kirgisistan	**NO**	Norwegen	**YU**	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**NZ**	Neuseeland	**ZW**	Zimbabwe
CM	Kamerun			**PL**	Polen		
CN	China	**KR**	Republik Korea	**PT**	Portugal		
CU	Kuba	**KZ**	Kasachstan	**RO**	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	**LC**	St. Lucia	**RU**	Russische Föderation		
DE	Deutschland	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Dänemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Schweden		
EE	Estland	**LR**	Liberia	**SG**	Singapur		

BNSDOCID: <WO___9942481A3_I_>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In tional Application No
T/DE 99/00554

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K14/47 C07K19/00 A61K38/17 G01N33/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 757 994 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD) 12 February 1997 (1997-02-12) page 2, line 8 - line 9; claims; examples ---	1
X	WO 96 16170 A (EISAI CO LTD ;STADDON JAMES MICHAEL (GB)) 30 May 1996 (1996-05-30) claims; examples ---	1,2
P,A	WO 98 45319 A (UNIV MCGILL ;GOUR BARBARA J (CA); BLASCHUK OREST W (CA)) 15 October 1998 (1998-10-15) page 39, line 28 -page 40, line 4; claims; examples ---	1
P,X	WO 98 42296 A (ONYX PHARMA INC) 1 October 1998 (1998-10-01) cited in the application claims; examples ---	1,2

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 November 1999	14/12/1999

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fuhr, C

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

BNSDOCID: <WO___9942481A3_I_>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 99/00554

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 98 41631 A (UTRECHT UNIVERSITY ;UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 24 September 1998 (1998-09-24) cited in the application claims; examples	1,2
T	O. TETSU AND F MCCORMICK: "beta-Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells" NATURE, vol. 398, 1 April 1999 (1999-04-01), pages 422-426, XP002123343 LONDON GB page 426, left-hand column, paragraph 3	1

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE 99/00554

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although Claims 16-19 and 30-33 relate to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

2. ☒ Claims Nos.: 29
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplemental sheet Additional Matter PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

BNSDOCID: <WO___9942481A3_I_>

Continuation of Field I.2

Claim No. 29

The relevant Patent Claim No. 29 relates to an excessively large number of possible compounds/products. In fact, they include so many options and variable possible permutations and/or limitations that they appear unclear and/or too lengthy under the terms of PCT Article 6 as if they facilitated a meaningful search. For this reason, the search was directed at the sections of the Patent Claims which can be regarded as clear and/or understood as being concise, namely: 1-28 and 30-35.

The applicant is therefore advised that patent claims or sections of patent claims laid to inventions for which no international search report was drafted cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). Similar to the authority entrusted with the task of carrying out the international preliminary examination, the EPO also does not generally carry out a preliminary examination of subject matter for which no search has been conducted. This is also valid in the case when the patent claims have been amended after receipt of the international search report (PCT Article 19), or in the case when the applicant submits new patent claims pursuant to the procedure in accordance with PCT Chapter II.

BNSDOCID: <WO___9942481A3_I_>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/DE 99/00554

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0757994 A	12-02-1997	AU 698221 B	29-10-1998
		AU 4355196 A	19-07-1996
		FI 963313 A	26-08-1996
		NO 963552 A	28-10-1996
		CA 2183856 A	28-06-1996
		HU 75236 A	28-04-1997
		WO 9620214 A	04-07-1996
		NZ 298142 A	22-08-1997
		ZA 9510982 A	22-08-1996
WO 9616170 A	30-05-1996	EP 0792360 A	03-09-1997
		JP 10509869 T	29-09-1998
WO 9845319 A	15-10-1998	AU 6914798 A	30-10-1998
WO 9842296 A	01-10-1998	AU 6866198 A	20-10-1998
WO 9841631 A	24-09-1998	US 5851775 A	22-12-1998
		AU 6765898 A	12-10-1998

BNSDOCID: <WO___9942481A3_I_>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In ...tionales Aktenzeichen
PCT/DE 99/00554

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANM...UNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K14/47 C07K19/00 A61K38/17 G01N33/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07K A61K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 757 994 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD) 12. Februar 1997 (1997-02-12) Seite 2, Zeile 8 - Zeile 9; Ansprüche; Beispiele	1
X	WO 96 16170 A (EISAI CO LTD ;STADDON JAMES MICHAEL (GB)) 30. Mai 1996 (1996-05-30) Ansprüche; Beispiele	1,2
P,A	WO 98 45319 A (UNIV MCGILL ;GOUR BARBARA J (CA); BLASCHUK OREST W (CA)) 15. Oktober 1998 (1998-10-15) Seite 39, Zeile 28 -Seite 40, Zeile 4; Ansprüche; Beispiele	1

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
19. November 1999	14/12/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Fuhr, C

1

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

BNSDOCID: <WO___9942481A3_I_>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 99/00554

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 98 42296 A (ONYX PHARMA INC) 1. Oktober 1998 (1998-10-01) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche; Beispiele	1,2
P,X	WO 98 41631 A (UTRECHT UNIVERSITY ;UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 24. September 1998 (1998-09-24) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche; Beispiele	1,2
T	O. TETSU AND F MCCORMICK: "beta-Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells" NATURE, Bd. 398, 1. April 1999 (1999-04-01), Seiten 422-426, XP002123343 LONDON GB Seite 426, linke Spalte, Absatz 3	1

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

...ternationales Aktenzeichen
PCT/DE 99/ 00554

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. [X] Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 16-19 und 30-33 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

2. [X] Ansprüche Nr. 29
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210

3. [] Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. [] Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. [] Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. [] Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. [] Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

[] Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

[] Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

BNSDOCID: <WO___9942481A3_I_>

WEITERE ANGABEN PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 29

Der geltende Patentanspruch 29 bezieht sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen/Produkte. In der Tat umfassen sie so viele Wahlmöglichkeiten, Veränderliche, mögliche Permutationen und/oder Einschränkungen, daß sie im Sinne von Art. 6 PCT in einem solchen Maße unklar (und/oder zu weitläufig gefasst) erscheinen, als daß sie eine sinnvolle Recherche ermöglichten. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, die als klar (und/oder knapp gefaßt) gelten können, nämlich 1-28 und 30-35.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

BNSDOCID: <WO___9942481A3_I_>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 99/00554

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0757994 A	12-02-1997	AU 698221 B	29-10-1998
		AU 4355196 A	19-07-1996
		FI 963313 A	26-08-1996
		NO 963552 A	28-10-1996
		CA 2183856 A	28-06-1996
		HU 75236 A	28-04-1997
		WO 9620214 A	04-07-1996
		NZ 298142 A	22-08-1997
		ZA 9510982 A	22-08-1996
WO 9616170 A	30-05-1996	EP 0792360 A	03-09-1997
		JP 10509869 T	29-09-1998
WO 9845319 A	15-10-1998	AU 6914798 A	30-10-1998
WO 9842296 A	01-10-1998	AU 6866198 A	20-10-1998
WO 9841631 A	24-09-1998	US 5851775 A	22-12-1998
		AU 6765898 A	12-10-1998

BNSDOCID: <WO___9942481A3_I_>